八棱海棠种子超低温保存中含水量对糖代谢的影响

彭颖[1]，朱梦婷[1]，乔谦[1]，李杏[1]，张玥[1]，皮晓飞[2]，刘燕[1*]

（1. 花卉种质创新与分子育种北京市重点实验室，国家花卉工程技术研究中心，城乡生态环境北京实验室，林木花卉遗传育种教育部重点实验室，北京林业大学园林学院，北京 100083；2. 国家植物园，北京 100093）

摘要：含水量是影响种子超低温保存效果的关键因素，而其作用机制尚不完全清楚。为探讨含水量对种子超低温保存生活力的影响途径，该研究以八棱海棠种子为材料，通过硅胶干燥法获得不同含水量的种子，测定超低温保存后种子生活力、糖含量及相关酶指标的变化并分析相关性。结果表明：（1）超低温保存 15 d 后，不同含水量种子生活力不同，随着种子含水量的降低，种子生活力呈现先升高后降低的趋势，含水量为 9.02%的八棱海棠种子生活力最高，为 53.33%；超低温保存 120 d 后，种子生活力随着含水量下降一直升高，含水量为 6.40%生活力最高，为 27.78%。表明八棱海棠种子含水量对超低温保存后的生活力有明显影响，但受液氮保存时间影响，随着液氮保存时间的延长，最适含水量降低。（2）相关性分析显示，含水量与生活力显著负相关，含水量和生活力均与蔗糖和果糖含量相关，酸性转化酶与含水量、生活力、蔗糖和果糖均相关，果糖激酶与生活力相关，表明种子含水量通过影响酸性转化酶活性而影响蔗糖和果糖含量，进而影响蔗糖代谢，响应低温和脱水胁迫，最终导致生活力差异。种子生活力还受到介导果糖激酶的果糖代谢影响。此外，海藻糖也是种子应对脱水和低温胁迫重要的调节物质之一。综上所述，八棱海棠种子不同含水量对其超低温保存后生活力有明显影响，与蔗糖和果糖代谢差异有关。该研究为种子超低温保存机制揭示提供了理论参考。

关键词：八棱海棠，种子超低温保存，含水量，糖代谢

中图分类号：Q945　　**文献标志码：**A

Effect of water content on sugar metabolism of *Malus* × *robusta* seeds cryopreservation

PENG Ying[1], ZHU Mengting[1], QIAO Qian[1], LI Xing[1], ZHANG Yue[1], PI Xiaofei[2], LIU Yan[1*]

（1. *Beijing Key Laboratory of Ornamental Plants Germplasm Innovation & Molecular Breeding , National Engineering Research Center for Floriculture , Beijing Laboratory of Urban and Rural Ecological Environment , Key Laboratory of Genetics and Breeding in Forest Trees and Ornamental Plants of Ministry of Education , School of Landscape Architecture , Beijing Forestry University,* Beijing 100083, China; 2. *China National Botanical Garden,* Beijing 100093, China）

Abstract: Water content is a key factor influencing the seed cryopreservation, but its effecting mechanism is not fully understood. In order to provide theoretical basis for further improving the seeds viability after cryopreservation, the effect and way of water content on the viability of seed cryopreservation were explored. *Malus* × *robusta* seeds with different water contents were obtained by silica gel. The seed viability, sugar content and related enzyme indexes before and after cryopreservation were measured and correlation analysis were done. The results were as follows: (1) After 15 days of cryopreservation, the viability of seeds with different water contents was different, and the viability of seeds showed a trend of increasing and then decreasing as the water content of seeds decreased, and the seeds with 9.02% water content had the highest germination rate, at 53.33%. But after 120 days of cryopreservation, the viability of seeds increased as the water content decreased, and the seeds with 6.40%water content got the highest germination rate, at 27.78%. This indicates that the water content of *Malus* × *robusta* seeds has a significant effect on the viability after cryopreservation. It is affected by the storage time in liquid nitrogen,

基金项目：国家自然科学基金（31770741）；雄安新区科技创新专项（2022XAGG0100）。

第一作者：彭颖（1998-），硕士，主要研究方向为植物种质资源保存，(E-mail)pengying_hallo@163.com。

***通信作者：**刘燕，博士，教授，主要研究方向为植物种质资源保存，(E-mail)chblyan@163.com。

and the optimum water content decreases as the storage time extended in liquid nitrogen. (2) Correlation analysis showed that water content was significantly negatively correlated with viability, both water content and viability were correlated with sucrose and fructose content, acid invertase was correlated with water content, viability, sucrose and fructose, and fructokinase was correlated with viability, suggesting that water content affects the content of sucrose and fructose through effecting the activity of acid converting enzymes, which in turn affects sucrose metabolism to respond to low temperature and dehydration stress, ultimately leading to differences in viability. The seed viability is also affected by fructose metabolism through fructose kinase. Besides, alginate is one of the important regulatory substances of *Malus* × *robusta* seeds in response to water and low temperature stresses. In summary, water content has a significant effect on the viability of *Malus* × *robusta* seeds cryopreservation through the combined effect of sucrose and fructose metabolism. This study provides a theoretical reference to further explore the cryopreservation mechanism of seed.

Key words: *Malus* × *robusta*; seed cryopreservation; water content; sugar metabolism

八棱海棠（*Malus* × *robusta*）隶属于蔷薇科(Rosaceae)苹果属（*Malus*）(陆秋农和贾定贤, 1999)，是重要的种质资源，其适应性和抗逆性均较强，既是优秀的观赏海棠，也是一种优良的苹果砧木(河北省农林科学院昌黎果树研究所, 1986)，主要通过播种提供砧木苗，因此，其种子资源保存具有重要意义。超低温保存是种质永久保存最有潜力的技术，具有环保、方便、节约成本等诸多优点，受到广泛关注。目前仅见八棱海棠在低温（-35~5 ℃）贮藏的报道，瓶装密封在 0~5 ℃冰箱冷藏保存效果较好(何建斌等, 2022)。因此研究八棱海棠种子的超低温保存，实现其种质资源的永久保存具有重要的应用价值。

含水量是影响种子生活力的关键因素之一(Chmielarz, 2009; Wen et al., 2009)，大量研究表明，超低温保存后，只有在适宜的种子含水量时才能获得较高的萌发率(Generoso et al., 2019; 张晓宁等, 2020)，但其作用机制尚不完全清楚，一般认为含水量变化与细胞低温损伤“两因素假说”相关，即慢速冷冻会引起细胞逐渐脱水，发生溶质损伤，快速冷冻会引起细胞发生冰晶损伤(Mazur et al., 1972)。近年来研究也显示，ROS 介导的氧化应激可能是含水量变化导致种子超低温保存活力降低的损伤机制之一(曹柏, 2016; 李萍, 2018)。

研究表明，在特定的逆境条件下，糖在压力感知、信号传递和胁迫介导的基因表达中发挥着关键作用，确保渗透调节反应、清除 ROS，并通过碳分配维持细胞能量状态(Saddhe et al., 2021)。其中糖含量与相关酶活性是较为敏感的指标，易受环境因素的影响，并对胁迫做出反应(方诗雯, 2018)。不同含水量种子超低温保存中面临低温和脱水双重胁迫，那么含水量是否会通过影响糖代谢进而影响超低温保存后种子的萌发尚未见报道。

本文以八棱海棠种子为材料，通过研究超低温保存的适宜含水量，并探究不同含水量种子超低温保存效果差异的生理基础，拟探讨以下问题：（1）含水量是否会影响八棱海棠种子超低温保存后的生活力？（2）含水量影响超低温保存生活力的作用机制？本研究为进一步提高种子超低温保存后的生活力提供依据。

1　材料与方法

1.1　供试材料

八棱海棠种子购于河北省怀来县绿欣八棱海棠苗木基地，初始含水量为 27.12%，沙藏 60 d 后用于本试验。

1.2　方法

1.2.1　种子不同含水量的调制及测定

用硅胶干燥不同时间，获得不同含水量的种子：W1（27.12%）、W2（20.32%）、W3（15.10%）、W4（9.02%）和 W5（6.40%），含水量随干燥时间的变化具体见图 1。

种子含水量用烘箱干燥法测定：取 30 粒种子，称重记为 A；将种子放在称量皿中，称重记为 B；一起放入 105 ℃烘箱中烘干至恒重，待冷却后测定种子和称量皿的总重，记为 C。按照公式计算含水量，种子含水量=(B-C)/A×100%。每个处理含 30 粒种子，设置 3 个重复，取均值。

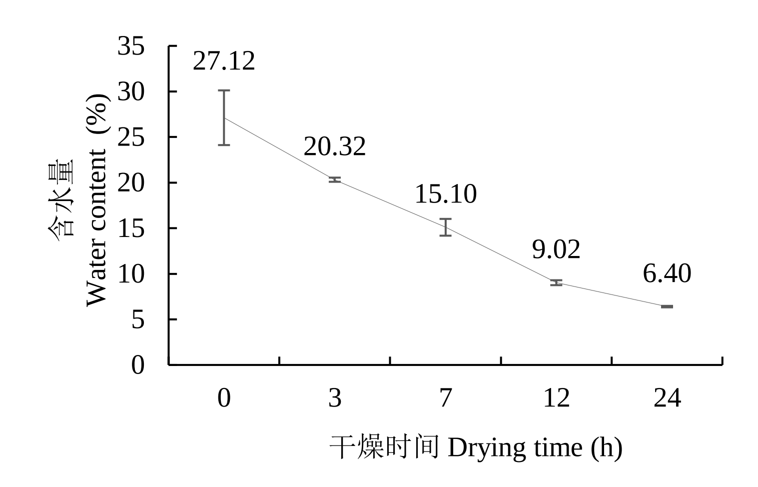


图 1 八棱海棠种子含水量随干燥时间的变化

Fig. 1 Variation of seed water content of *Malus*× *robusta* with drying time

1.2.2 种子超低温保存及化冻方法

以 100 粒种子为一份，用锡纸包装后装入网兜，再投入液氮分别保存 15 d 和 120 d，试验时快速取出，用 40 ℃水浴化冻 5 min，备用。

1.2.3 种子萌发测定方法

将沙藏后的种子用清水洗净，均匀播于放有 1 层滤纸的一次性培养皿中，置于光照培养箱中：夜间温度 20 ℃，8 h；白天温度 25 ℃，16 h；相对湿度在 60%以上。每天定时观察，记载发芽数。以胚根长度大于种子长度的一半时视为发芽(李扬汉, 1984)。按照下列公式计算生活力：

发芽率（%）=发芽种子数/供试种子数×100%；

发芽势（%）=发芽高峰期萌发的种子数/供试种子数×100%；

发芽指数（GI）=∑Gt/Dt（Gt 是时间在 t 日的发芽数，Dt 是对应的发芽天数）。

每个处理 30 粒种子，重复 3 次，取均值。

1.2.4 糖代谢相关指标测定方法

可溶性糖含量测定采用蒽酮法(刘萍和李明军, 2016)；果糖含量测定采用果糖试剂盒（科铭生物，货号 GT-2-Y）;蔗糖含量测定采用蔗糖试剂盒（科铭生物，货号 ZHT-2-Y）；葡萄糖含量测定采用葡萄糖试剂盒（科铭生物，货号 PT-2-Y）；海藻糖含量测定采用海藻糖含量测试盒（科铭生物，货号 HT-2-Y）；山梨醇含量测定采用山梨醇含量测试盒（科铭生物，货号 SC-2-Y）；

淀粉含量测定采用蒽酮法(刘萍和李明军, 2016)；直链淀粉含量测定采用直链淀粉试剂盒（科铭生物，货号 ZDF-2-Y）；支链淀粉含量测定采用支链淀粉试剂盒（科铭生物，货号 ZHDF-2-Y）；

蔗糖磷酸合成酶活性测定采用蔗糖磷酸合成酶试剂盒（科铭生物，货号 SPS-2-Y）；蔗糖合成酶（合成方向 SS-II）活性测定采用蔗糖合成酶（合成方向 SS-II）试剂盒（科铭生物，货号 SSII-2-Y）；中性转化酶活性测定采用中性转化酶试剂盒（科铭生物，货号 NI-2-Y）；酸性转化酶活性测定采用酸性转化酶试剂盒（索莱宝，货号 BC0560）；蔗糖合成酶（分解方向 SS-I）活性测定采用蔗糖合成酶（分解方向 SS-I）试剂盒（科铭生物，货号 SSI-2-Y）；果糖激酶活性测定采用果糖激酶试剂盒（科铭生物，货号 FRK-2-Y）；

以上各种物质测定操作步骤按照试剂盒说明书进行。每处理重复 3 次，取均值。

1.3 数据处理与分析

数据用 Excel 软件进行整理及图表制作，采用 SPSS 26.0 软件进行单因素 ANOVA 分析，Origin 做相关性分析。

2 结果与分析

2.1 八棱海棠不同含水量种子超低温保存后生活力变化

种子含水量对超低温保存后种子生活力有明显影响，见表 1。

超低温保存 15 d 后，随着含水量降低，生活力呈单峰变化，即呈现先升高再降低的趋势，含水量为 9.02%（W4）的种子生活力显著高于其他含水量种子，发芽率为 53.33%，发芽势为 33.33%，发芽指数为

20.52。自然含水量 27.12 %（W1）种子保存后丧失生活力，较高含水量 20.32%（W2）种子发芽率仅为 6.67%，显著低于含水量 15.10%（W3）的 32.22%和 6.40%（W5）的 33.33%。

超低温保存 120 d 后，各含水量种子的生活力均下降，保存 15 d 时生活力最高的 W4 种子生活力下降最大，发芽率由 53.33%降至 25.56%，已与 W3 和 W5 种子无显著差异。随着含水量的降低，种子生活力一直升高，含水量为 6.40%（W5）的种子生活力最高，发芽率为 27.78%，发芽势为 23.33%，发芽指数为 13.27。

表 1 八棱海棠种子含水量超低温保存后生活力的变化

Table 1 Changes of *Malus* × *robusta* seed viability after cryopreservation

含水量 Water content (%)	发芽率 Germination rate (%)		发芽势 The germination (%)		发芽指数 Germination index	
	LN 保存 15 d 后 Keep LN for 15 d	LN 保存 120 d 后 Keep LN for 120 d	保存 15 d 后 Keep LN for 15 d	LN 保存 120 d 后 Keep LN for 120 d	保存 15 d 后 Keep LN for 15 d	LN 保存 120 d 后 Keep LN for 120 d
27.12（W1）	0.00±0.00Ca	0.00±0.00Ba	0.00±0.00Ba	0.00±0.00Ba	0.00±0.00Ca	0.00±0.00Ba
20.32（W2）	6.67±6.67Ca	5.56±1.92Ba	5.56±5.09Ba	4.44±1.92Ba	3.46±3.17Ca	3.24±1.17Ba
15.10（W3）	32.22±5.09Ba	23.33±6.67Aa	11.94±8.35Ba	17.78±1.92Aa	11.53±4.47Ba	12.22±4.23Aa
9.02（W4）	53.33±8.82Aa	25.56±6.94Ab	33.33±8.82Aa	20.00±5.77Aa	20.52±5.33Aa	12.00±3.01Aa
6.40（W5）	33.33±3.33Ba	27.78±10.18Aa	27.78±5.09Aa	23.33±11.55Aa	15.55±0.99ABa	13.27±5.04Aa

注：不同大写字母表示相同处理组不同含水量种子差异显著（P<0.05）；不同小写字母表示相同含水量种子超低温保存 15 d 和 120 d 差异显著(P<0.05)。

Note: Different capital letters indicate significant differences in seeds with different water content in the same treatment group (P<0.05). Different lowercase letters indicated that seeds with the same water content were significantly different after 15 days and 120 days of cryopreservation (P<0.05).

2.2 八棱海棠种子含水量在超低温保存 15 d 后糖含量的变化

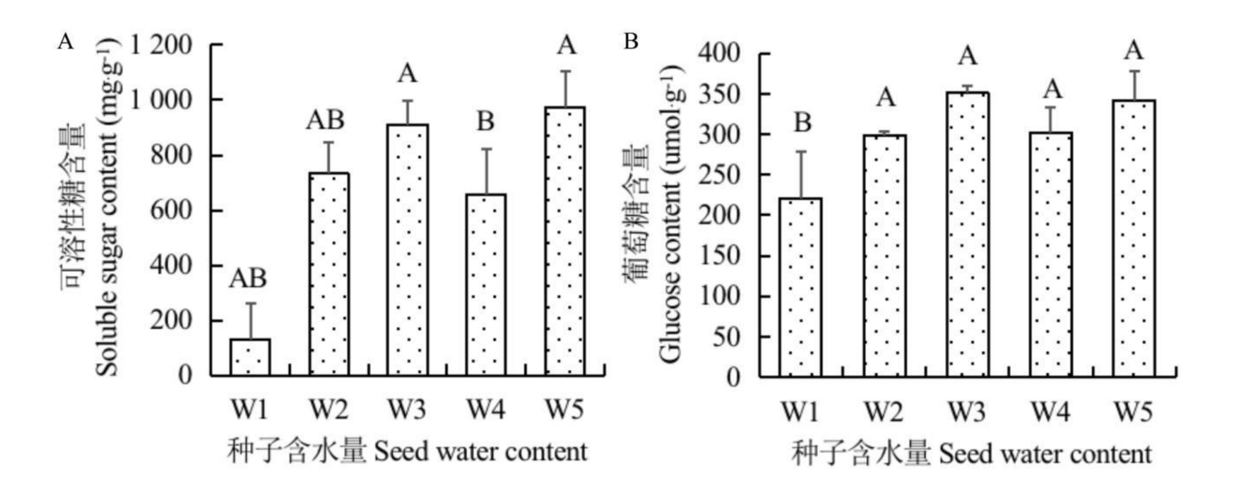
液氮保存 15 d 后，不同含水量八棱海棠种子超低温保存后可溶性糖总量的变化如图 2：A 所示，具有最高生活力的 W4 种子（含水量 9.02%），其可溶性糖总量显著低于其他各组，但种子含水量降至 6.40%（W5）时，可溶性糖含量有升高，且与其他高含水量种子没有显著差异。

进一步测定不同含水量八棱海棠种子超低温保存后葡萄糖含量的变化，结果见图 2：B。与可溶糖含量变化趋势不同，自然含水量种子（W1）的葡萄糖含量显著低于其他组，生活力较高的 W4 种子含量较低，但与其余含水量种子之间差异不显著。

不同含水量八棱海棠种子超低温保存后蔗糖含量的变化不大，见图 3。仅液氮保存后丧失活生活力的自然含水量 W1 种子蔗糖含量显著低于其他含水量，其他含水量种子之间差异不显著，从变化趋势看，低含水量的 W3~W5 种子蔗糖含量要高于较高含水量的 W1 和 W2 种子。

超低温保存后，随着种子含水量降低，其果糖含量升高，高含水量 W1 和 W2 种子与较低含水量 W3~W5 种子差异显著；虽然含水量 W4 的种子果糖含量最高，但与 W3 和 W5 差异不显著。

不同含水量之间的海藻糖和山梨醇含量变化趋势一致，高含水量 W1 和 W2 种子的含量显著低于较低含水量，随着含水量降低，一致呈升高趋势，W5 种子海藻糖和山梨醇含量最高，与 W3 和 W4 种子的海藻糖含量差异显著，而山梨醇含量差异不显著。



不同大写字母表示相同处理组不同含水量种子差异显著（$P<0.05$），下同。

Different capital letters indicate significant differences in seeds with different water content in the same treatment group ($P<0.05$), the same below.

图 2 不同含水量八棱海棠种子超低温保存 15 d 后可溶性糖总糖和葡萄糖含量的变化

Fig. 2 Changes of soluble sugar and glucose contents in seeds of *Malus* × *robusta* with different water content after 15 days of cryopreservation

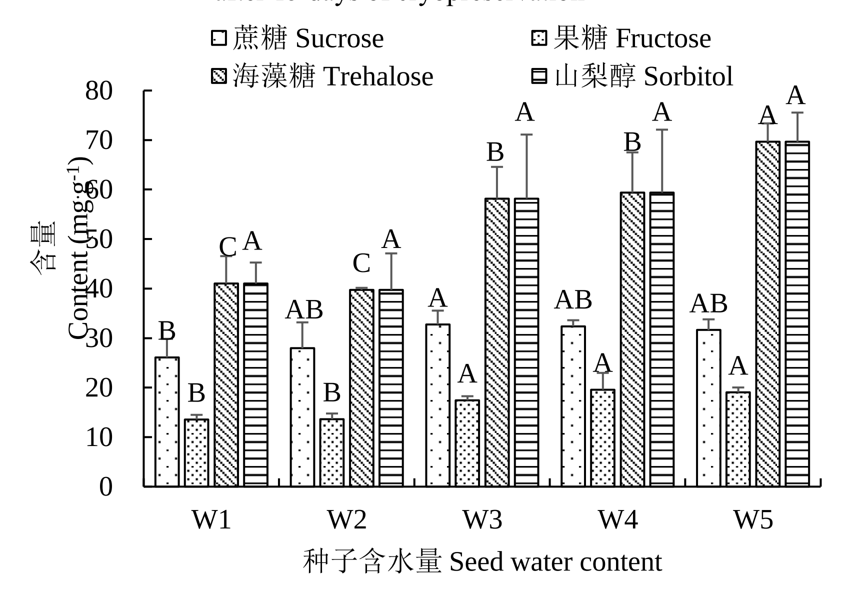


图 3 不同含水量八棱海棠种子超低温保存 15 d 后蔗糖、果糖、海藻糖和山梨醇含量的变化

Fig. 3 Changes of sucrose, fructose, trehalose and sorbitol contents in different water content of *Malus* × *robusta* seeds after 15 days of cryopreservation

不同含水量八棱海棠种子超低温保存后淀粉含量的变化见图 4。八棱海棠种子中支链淀粉含量明显高于直链淀粉含量，约为其 5 倍左右。随着含水量的降低，淀粉含量和直链淀粉含量均有先升高再降低的趋势。液氮冻后丧失生活力的 W1 种子的直链淀粉含量显著低于其他含水量，各含水量间的支链淀粉含量未见明显差异。

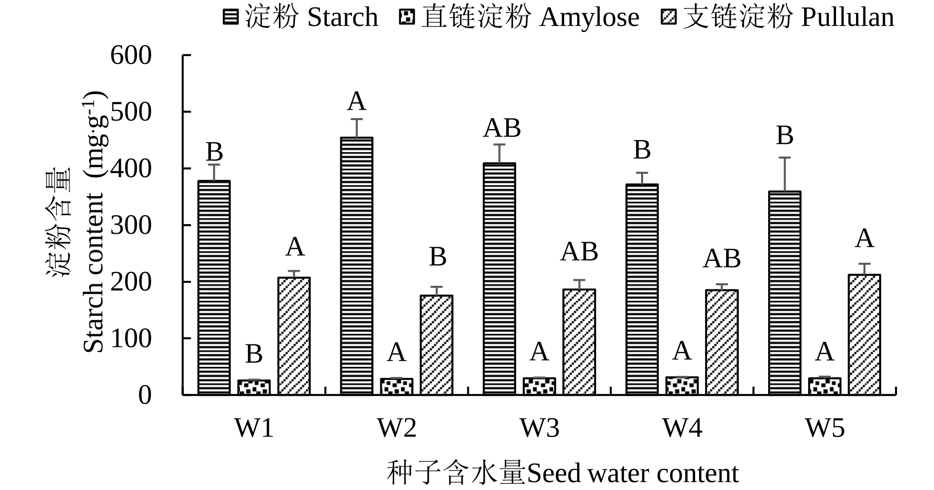
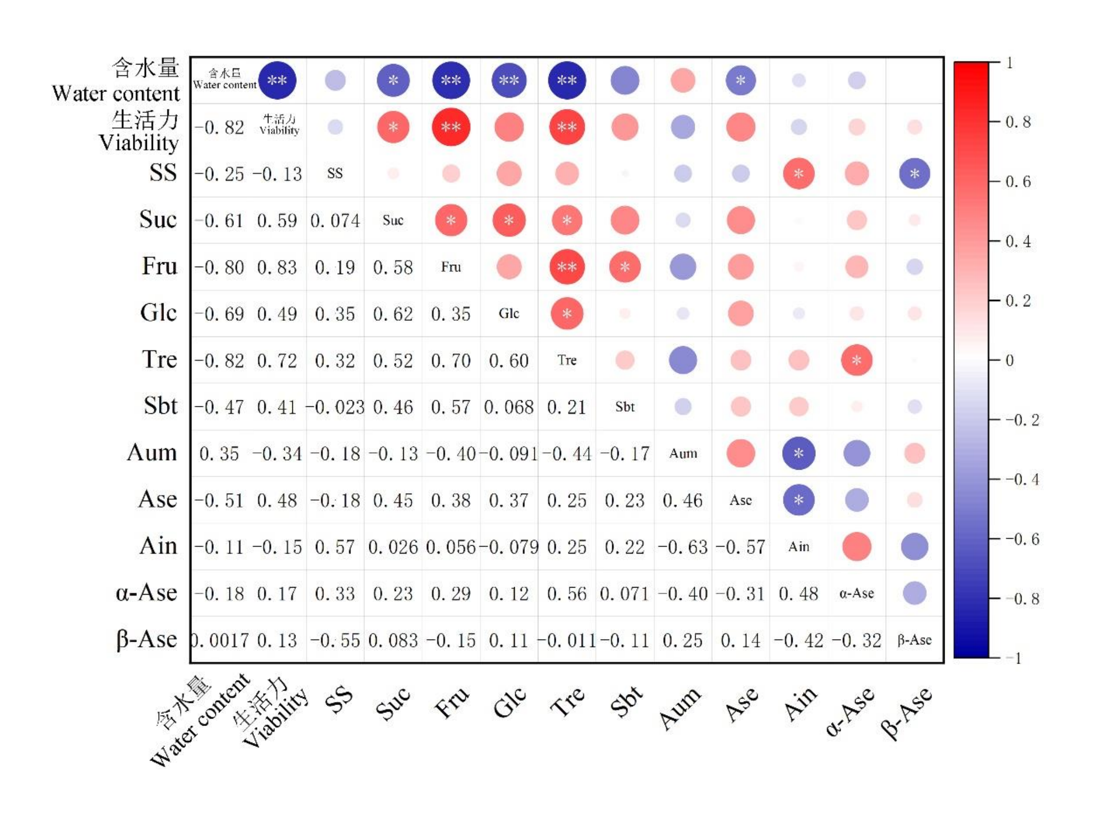


图 4 不同含水量八棱海棠种子超低温保存 15 d 后淀粉含量的变化

Fig. 4 Changes of starch content in different water content of *Malus* × *robusta* seeds after 15 days cryopreservation

2. 3　八棱海棠种子超低温保存后生活力、含水量与糖含量指标的相关性分析

超低温保存 15 d 后，生活力、含水量与糖含量指标的相关性分析结果见图 5。含水量与生活力呈极显著负相关关系，相关系数为 0.82，还与蔗糖、果糖、葡萄糖、海藻糖和直链淀粉显著负相关。生活力与蔗糖呈显著正相关，相关系数分别为 0.59，与果糖和海藻糖呈极显著正相关，相关系数为 0.83 和 0.72，蔗糖含量与果糖含量和海藻糖含量也有显著正相关性。15 d 液氮保存表明，种子含水量可以影响蔗糖和果糖代谢，故追踪测定液氮保存 120 d 后不同含水量种子的生活力（表 1）、蔗糖和果糖含量变化及相关代谢酶活性关系。



*表示在 $P \leq 0.05$ 水平上显著相关；**表示在 $P \leq 0.01$ 水平上显著相关。**SS.** 可溶性糖；**Suc.** 蔗糖；**Glc.** 葡萄糖；**Fru.** 果

糖；**Tre.** 海藻糖；**Sbt.** 山梨醇 ；**Aum.** 淀粉；**Ase.** 直链淀粉；**Ain.** 支链淀粉。

*indicates significant correlation at the $P \leqslant 0.05$ level; **indicates significant correlation at the $P \leqslant 0.01$ level. **SS.** Soluble sugar; **Suc.** Sucros; **Glc.** Glucose; **Fru.** Fructose; **Tre.** Trehalose; **Sbt.** Sorbitol; **Aum.** Starch; **Ase.** Amylose; **Ain.** Amylopectin.

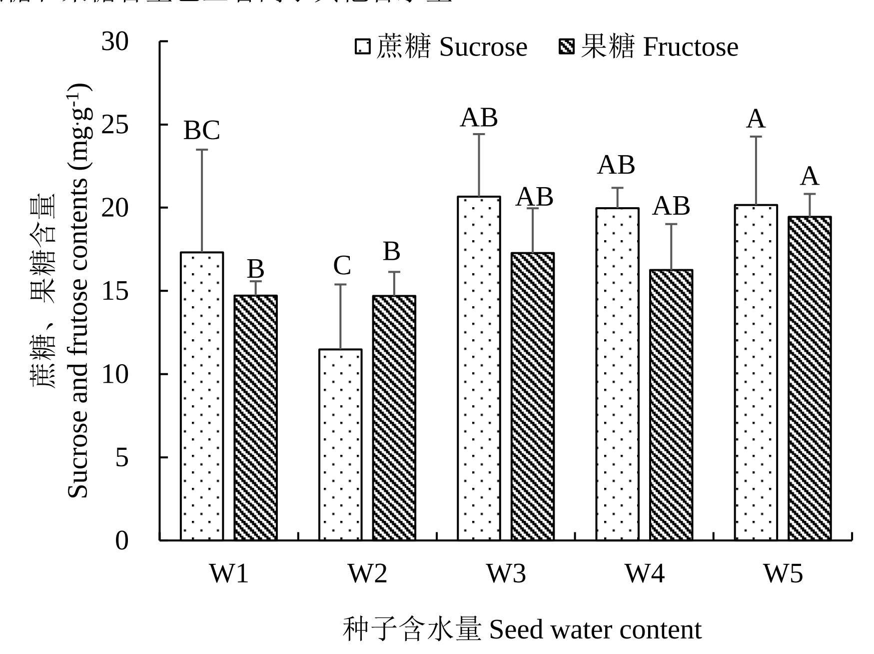
图 5 八棱海棠种子超低温保存 15 d 后生活力、含水量与糖含量的相关性

Fig. 5 Correlation between viability, water content and sugar content of *Malus* × *robusta* seeds after 15 days of cryopreservation

2.4　八棱海棠种子含水量对超低温保存 120 d 后糖代谢相关指标的影响

2.4.1　八棱海棠不同含水量种子超低温保存 120 d 后蔗糖和果糖含量变化

各个含水量的种子在液氮保存 120 d 后的蔗糖含量均显著低于保存 15 d 后的蔗糖含量，结果见图 6。低含水量（W3~W5）种子的蔗糖和果糖含量也高于高含水量（W1~W2）种子，且保存 120 d 后生活力最高的 W5 种子的蔗糖和果糖含量也显著高于其他含水量。



不同大写字母表示相同处理组不同含水量种子差异显著（$P<0.05$），下同。

Different capital letters indicate significant differences in seeds with different water content in the same treatment group ($P<0.05$), same as below.

图 6 八棱海棠种子不同含水量超低温保存 120 d 后蔗糖和果糖含量的变化

Fig. 6 Changes of sucrose and fructose contents in seeds of *Malus* × *robusta* after 120 days of cryopreservation with different water content

2.4.2　超低温保存 120 d 后蔗糖代谢酶活性变化

八棱海棠不同含水量种子超低温保存 120 d 后蔗糖合成相关酶的变化如图 7：A 所示，蔗糖磷酸合成酶（Sucrose phosphate synthetase, SPS）和蔗糖合成酶（合成方向）（Sucrose synthetase (synthesis), SS-II）活性均变化没有一定规律性。W2 种子 SPS 活性显著高，而 W3 显著低，高含水量的 W1 种子与低含水量的 W4 和 W5 没有显著差异；高含水量的自然含水量 W1 种子的 SS-II活性最高，但与低含水量组 W3 和 W5 组也无显著差异。

八棱海棠不同含水量种子超低温保存 120 d 后蔗糖分解相关酶的变化如图 7：B 所示。3 种酶活性均没有随种子含水量变化呈规律性变化。超低温保存 120 d 后，各含水量种子的蔗糖中性转化酶（Neutral invertase, NI）和蔗糖合成酶（分解方向）（Sucrose synthetase (decomposition), SS-I）活性差异不明显。生活力最高的 W5 种子的酸性转化酶（Acid invertase, AI）显著高于其他含水量种子，生活力随液氮保存时间下降最明显的 W4 种子 AI 活性最低，但 W1~W4 之间没有显著差异。

八棱海棠不同含水量种子超低温保存 120 d 后，蔗糖分解类酶活性高于蔗糖合成类酶活性，说明在八棱海棠中主要以蔗糖分解为主要代谢方向。

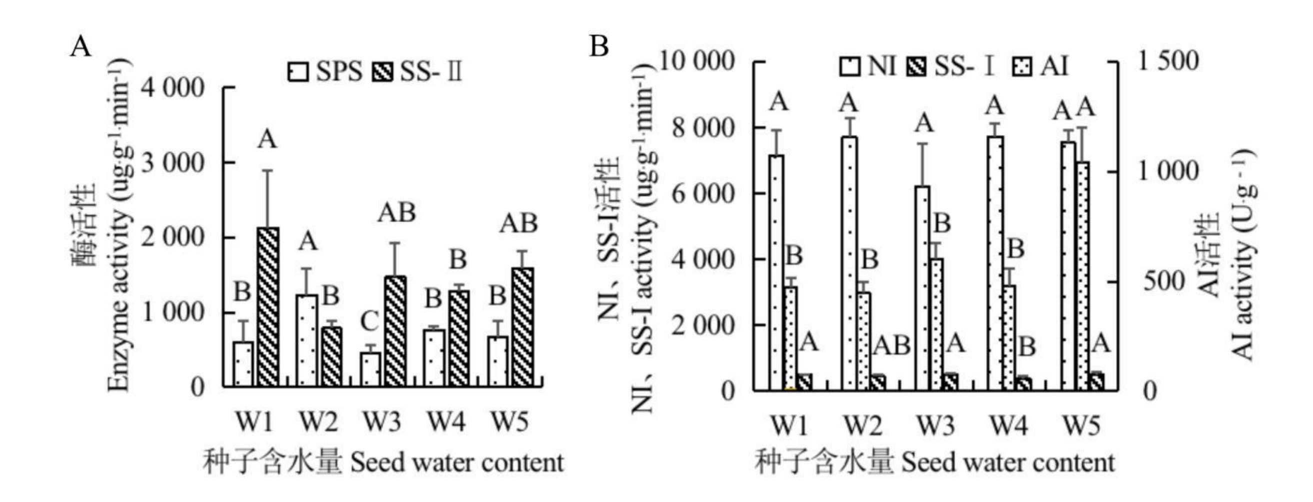


图 7 八棱海棠种子不同含水量超低温保存 120 d 后蔗糖代谢酶活性变化

Fig. 7 Changes of sucrose metabolism enzyme activity of *Malus* × *robusta* seeds after 120 days of cryopreservation with different water content

2.4.3 超低温保存 120 d 后果糖代谢酶活性变化

不同含水量种子果糖激酶（Fructokinase, FRK）活性变化结果见 8。液氮保存 120 d 后，FRK 活性变化呈单峰变化，低含水量 W3~W5 种子的 FRK 活性显著高于高含水量 W1~W2 种子，生活力降低最大的 W4 种子 FRK 活性值最大。

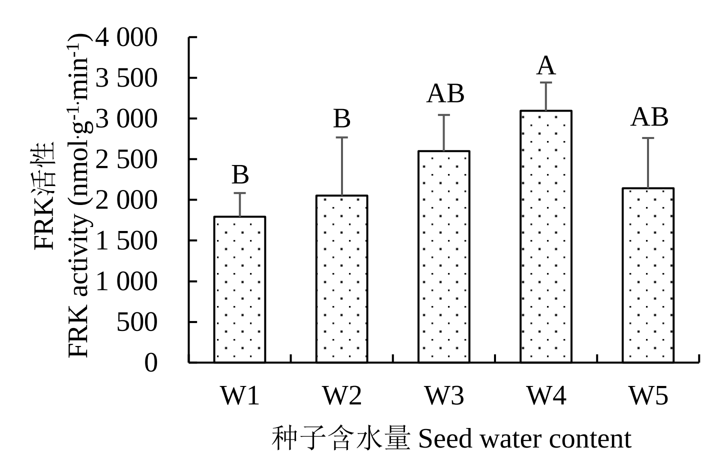
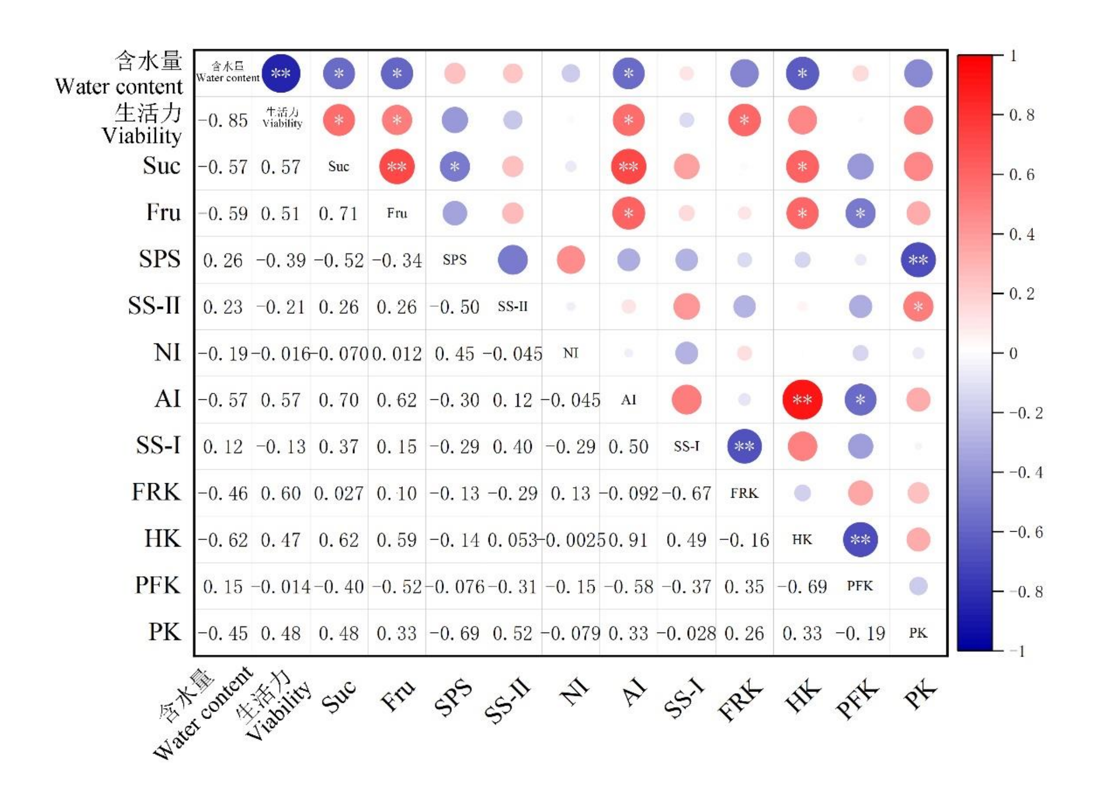


图 8 八棱海棠种子不同含水量超低温保存 120 d 后果糖代谢酶活性变化

Fig. 8 Changes of fructose-metabolizing enzyme activities in different water contents of *Malus* × *robusta* seeds after 120 days of cryopreservation

2.5 八棱海棠种子超低温保存 120 d 后生活力、含水量与糖含量和相关酶指标的相关性分析

超低温保存 120 d 后，种子含水量、生活力、和糖及其酶相关性见图 9 所示。相关分析显示与液氮保存 15 d 相同，含水量与生活力呈极显著负相关关系，相关系数为 0.85，含水量还与蔗糖、果糖含量负相关，生活力与蔗糖和果糖含量呈显著正相关关系，与 AI 活性和 FRK 活性也呈显著正相关，说明含水量通过影响蔗糖的分解成果糖影响了种子生活力，酸性转化酶在其中发挥了重要作用，同时果糖代谢也影响了种子的生活力。



*表示在 P≤0.05 水平上显著相关；**表示在 P≤0.01 水平上显著相关。**Suc.** 蔗糖；**Fru.** 果糖；**SPS.** 蔗糖磷酸合成酶；**SS-II.** 蔗糖合成酶（合成）；**NI.** 中性转化酶；**AI.** 酸性转化酶；**SS-I.** 蔗糖合成酶（分解）；**FRK.** 果糖激酶。

*indicates significant correlation at the P≤0.05 level. **indicates significant correlation at the P≤0.01 level. **Suc.** Sucros; **Fru.** Fructose; **SPS.** Sucrose phosphate synthetas; **SS-II.** Sucrose synthetase (synthesis); **NI.** Neutral invertas; **AI.** Acid invertase; **SS-I.** Sucrose synthetase (decomposition); **FRK.** Fructokinas.

图 9 八棱海棠种子超低温保存 120 d 后生活力、含水量与糖含量和相关酶的相关性

Fig. 9 Correlation between viability, water content and sugar content and related enzymes of *Malus* × *robusta* seeds after cryopreservation for 120 days

3 讨论

八棱海棠种子可以实现超低温保存，且含水量对超低温保存效果有重要影响。该试验中八棱海棠种子从自然含水量 27.12%逐渐降为 9.02%时，在液氮保存 15 d 后，种子发芽率呈逐渐升高趋势，此结果与马尾松（*Pinus massoniana*）(张晓宁等, 2020)、多花芍药（*Paeonia emodi*）(周好, 2021)和鸡蛋果（*Passiflora edulis*）(Generoso et al., 2019)等种子一样，含水量需要降到一定的水平（分别为 6.1%、8.87%和 10%）才能在液氮保存依然有较高生活力，这可能是由于生物组织含水量降低时会形成玻璃态，而含水量较高的植物进行超低温保存时，往往易在细胞内形成冰晶，破坏细胞结构，从而导致细胞死亡。八棱海棠种子在自然含水量状态下，液氮冻存 15 d 和 120 d 后生活力均丧失，该文还发现随着液氮冻存时间的延长，最适含水量也会随之降低。

近年来研究发现，参与糖代谢过程中的蔗糖、葡萄糖和果糖具有信号分子的功能，在植物遇到逆境的情况下，这些可溶性糖类直接或间接对植物进行调控，对逆境的胁迫做出应激反应(Wind et al., 2010)。尽管有些植物在低温胁迫下，糖含量会增加，但不同植物可能会积累不同的糖类物质。如耐低温的番茄（*Solanum lycopersicum*）品种在低温（4 ℃）胁迫时会积累果糖和葡萄糖(齐红岩等, 2012)；稻（*Oryza sativa*）在低温（平均温度 4.6 ℃）下积累可溶性总糖、还原性糖和蔗糖(Turhan & Ergin, 2012)。在该研究中，液氮保存 15 d 后，低含水量（W3~W5）种子的蔗糖和果糖含量均高于高含水量（W1~W2）种子，但此时活力最高的 W4 种子的可溶性糖和葡萄糖含量相比 W3 和 W5 种子较低。蔗糖和果糖与含水量和生活力均相关，

推测含水量可能通过影响可溶性糖中的蔗糖和果糖含量而影响生活力，适宜的含水量有利于八棱海棠种子蔗糖和果糖含量的积累，增加抗低温能力，需要进一步验证。

Wang 等研究表明叶片中蔗糖合成酶和转化酶活性的增强可加快蔗糖的快速循环，有利于蔗糖的积累，以抵抗干旱胁迫的影响(Wang et al., 2000)。SPS 催化蔗糖合成，SS 活性与蔗糖的分解与合成有关，但目前不同文献对这两种参与蔗糖代谢的相关酶在胁迫下的变化规律并不完全一致，苗期夜间低温处理会导致番茄叶片的 SS 和 SPS 活性受到抑制(Wang & Li, 2011；刘玉凤等, 2011)，小麦（*Triticum aestivum*）受低温胁迫后，不同器官 SS 和 SPS 基因的表达变化不同，分蘖中 SS 基因表达逐渐降低，叶片中 SS 基因表达先升高后降低，而 SPS 在叶片和分蘖中均表现为先升高再降低(Zeng et al., 2011)。蔗糖转化酶则参与蔗糖的分解，在植物体内，果糖可以通过蔗糖合成酶（分解方向）和蔗糖转化酶的作用下分解蔗糖而产生，该研究中发现果糖含量与蔗糖含量呈显著正相关，同时蔗糖和果糖与 AI 活性也具有显著相关性，说明八棱海棠种子超低温保存过程中蔗糖主要通过 AI 降解成分子量更小的果糖，供机体吸收，提高渗透调节能力以响应水分和低温胁迫，这与干旱条件可以提高苹果（*Malus pumila*）果实中 AI 活性，导致果实中蔗糖含量下降，果糖、葡萄糖含量上升，缓解了干旱对植物的影响研究结果一致(孙汉青, 2018)。但该文 SPS 和 SS 两种酶的活性与含水量以及生活力之间的相关性不显著，仅 SPS 与蔗糖相关，可能是糖含量与糖代谢酶活性之间有较为复杂的关系，错综复杂地调控着糖代谢，有待更多的研究数据解开诸多困惑。

果糖磷酸化是果糖进入代谢途径的第一道生化反应，其中起作用的高效酶则是 FRK，在调节细胞中的果糖浓度及响应环境胁迫中发挥了关键的作用(叶香媛和周文彬, 2021)，在盐胁迫和干旱胁迫下，FRK 基因分别在玉蜀黍（*Zea mays*）(Zörb et al., 2010)和向日葵（*Helianthus annuus*）幼苗叶片(Fulda et al., 2011)中表达量上调，此外，FRK 可能还在缺氧条件下对水稻幼苗碳水化合物代谢发挥重要作用(Guglielminetti et al., 2006)，该实验中也表明果糖激酶与超低温保存后生活力显著正相关，暗示果糖激酶在低温胁迫中发挥了一定作用。

海藻糖是一种双糖，可作为逆境胁迫下的信号和保护性物质(Suprasanna et al., 2016)，保持膜的完整性，清除活性氧(Zulfiqar et al., 2019)。有研究发现海藻糖参与了苹果果实中糖代谢的调节，维持了干旱条件下植物正常生长发育，缓解干旱对植物的影响(孙汉青, 2018)，外源添加海藻糖还可以缓解胁迫对植物的影响。该研究发现，低含水量种子的海藻糖含量要高于高含水量种子，且海藻糖与含水量和生活力均呈显著相关关系，说明海藻糖是八棱海棠种子应对水分和低温胁迫重要的调节物质之一，其具体影响方式还有待进一步研究。山梨醇是木本蔷薇科植物中主要的光合产物、同化物运输形式和可溶性的贮藏性碳水化合物主要的兼容溶质与抗氧化剂，作为小分子细胞相容物质，可以抵御生物和非生物胁迫(Noiraud et al., 2001)。在短期干旱胁迫下，山梨醇含量随干旱程度的加大而明显增加，其合成关键酶活性和基因表达也显著增加(张钊, 2016)，该试验中也发现随含水量的降低，八棱海棠种子山梨醇含量有所上升。

Bensari 等曾提出水分胁迫下淀粉含量的变化是植物抵御胁迫的内在因素的假说(Bensari et al., 1990)，一般认为淀粉降解、可溶性糖含量升高有利于抵抗外界环境胁迫。4 ℃低温下，甘薯（*Dioscorea esculenta*）中淀粉合成关键基因表达显著降低，而水解酶编码基因表达量显著升高(崔鹏等, 2022)；而有研究表明，低温胁迫时南极冰藻（*Chlamydomonas* sp.）淀粉合成酶的基因表达明显上调(林敏卓, 2012)。该实验中随着含水量降低，淀粉总量有先上升再下降的趋势，但淀粉含量与可溶性糖含量的变化相关程度不高，且未与含水量和生活力显著相关。可能是因为可溶性糖和淀粉含量的变化是一个动态过程，未在此阶段显示出明显的对应关系。

由于材料来源所限，该试验获得的八棱海棠种子是已经过沙藏 60 d 的种子。从超低温保存技术原理分析，采用未经过沙藏的处于深休眠期的种子液氮保存后生活力应该更高，后续可以进一步试验确定适宜采收期和超低温保存的适宜含水量，深休眠种子液氮贮存后对休眠解除的影响等问题也值得进一步研究。

4 结论

八棱海棠种子含水量对超低温保存后生活力有明显影响，但也受液氮保存时间影响，随着液氮保存时间的延长，最适含水量降低。种子含水量通过影响酸性转化酶活性，将蔗糖降解为分子量更小的果糖，以响应脱水和低温胁迫，从而影响种子生活力；种子生活力还受到通过果糖激酶的果糖代谢影响。此外，海藻糖也是八棱海棠种子应对脱水和低温胁迫重要的调节物质之一。

参考文献

BENSARI M, CALMES J, VIALA G. 1990. Water deficit and distribution of photosynthetic carbon between sucrose and starch.[J]. Acta Oecol, 11(6): 843-855.

CAO B. Effects of cryopreservation on physiological characteristics of *Iris ensata* seeds and establishment of regeneration system[D]. Harbin: Northeast Forestry Uniersity, 2016. [曹柏，2016. 超低温保存对玉蝉花种子生理特性影响及再生体系建立[D]. 哈尔滨：东北林业大学.]

Changli Fruit Research Institute, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences. 1986. Hebei fruit annals vol. 3: hebei apple annals[M]. Beijing: China Agriculture Press. [河北省农林科学院昌黎果树研究所. 1986. 河北省果树志第三卷河北省苹果志[M]. 北京：中国农业出版社.]

CHMIELARZ P. 2009. Cryopreservation of dormant european ash (*Fraxinus excelsior*) orthodox seeds[J]. Tree Physiol, 29(10): 1279-1285.

CUI P, ZHAO YR, YAO ZP, et al., 2022. Starch physicochemical properties and expression levels of anabolism key genes in sweet potato under low temperature[J]. Chin Agric Sci, 55(19): 3831-3840. [崔鹏，赵逸人，姚志鹏，等，2022. 低温对甘薯淀粉理化特性及代谢关键基因表达量的影响[J]. 中国农业科学，55(19)：3831-3840.]

FANG SW. Studies on the mechanism of carbohydrate metabolism in seeds of *Ginkgo biloba1*[D]. Shenyang: Shenyang Agr Uni, 2018. [方诗雯，2018. 银杏种子后熟过程中碳水化合物代谢机制研究[D]. 沈阳：沈阳农业大学.]

FULDA S, MIKKAT S, STEGMANN H, et al., 2011. Physiology and proteomics of drought stress acclimation in sunflower (helianthus annuus l.)[J]. Plant Biol (Stuttg), 13(4): 632-642.

GENEROSO AL, CARVALHO VS, WALTER R, et al., 2019. Mature-embryo culture in the cryopreservation of passion fruit (passiflora edulis sims) seeds[J]. Sci Hortic, 256: 108638.

GUGLIELMINETTI L, MORITA A, YAMAGUCHI J, et al., 2006. Differential expression of two fructokinases in oryza sativa seedlings grown under aerobic and anaerobic conditions[J]. J Plant Res, 119(4): 351-356.

HE JB, LI XX, YANG YH. 2022. Effects of seed storage conditions on germination of *Malus* × *robusta* seeds[J]. Hebei For Sci Technol, 2022(1): 46-47. [何建斌，李晓霞，杨沿辉. 2022. 八棱海棠种子储存条件对发芽的影响[J]. 河北林业科技，2022(1)：46-47.]

LI P. Study on cryopreservation of three germplasm resources of *Lonicera japonica*[D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2018. [李萍，2018. 金银忍冬 3 种种质资源超低温保存的研究[D]. 哈尔滨：东北林业大学.]

LI YH. 1984. Botany[M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press. [李扬汉. 1984. 植物学[M]. 上海：上海科学技术出版社.]

LIN MZ. Molecular cloning and functional analysis of anti-freeze genes from *Chlamydomonas* sp. ice-l[D]. Zibo: Shandong Instit Light Ind, 2012. [林敏卓，2012. 南极冰藻 *Chlamydomonas* sp. ice-l 低温胁迫相关基因的克隆和功能验证[D]. 淄博：山东轻工业学院.]

LIU P., LI MJ. 2016. Plant physiology experiments[M]. 第二版. Beijing: Science Press. [刘萍，李明军. 2016. 植物生理学实验[M]. 第二版. 北京：科学出版社.]

LIU YF, LI TL, JIAO XC. 2011. Effects of short-term sub-low night temperature treatment and recovery on photosynthesis and sucrose-metabolism of tomato leaves[J]. J Hortic, 38(4): 683-691. [刘玉凤，李天来，焦晓赤. 2011. 短期夜间亚低温及恢复对番茄光合作用和蔗糖代谢的影响[J]. 园艺学报，38(4)：683-691.]

LU QN, JIA DX. 1999. Chinese fruit tree zhi apple roll[M]. Beijing: China Forestry Publishing House. [陆秋农，贾定贤. 1999. 中国果树志苹果卷[M]. 北京：中国林业出版社.]

MAZUR P, LEIBO SP, CHU EH. 1972. A two-factor hypothesis of freezing injury. Evidence from chinese hamster tissue-culture cells.[J]. Exp Cell Res, 71(2): 345-355.

NOIRAUD N, MAUROUSSET L, LEMOINE R. 2001. Identification of a mannitol transporter, agmat1, in celery phloem[J]. Plant Cell, 13(3): 695-705.

SADDHE AA, MANUKA R, PENNA S. 2021. Plant sugars: homeostasis and transport under abiotic stress in plants[J]. Physiol Plant, 171(4): 739-755.
SUPRASANNA P, NIKALJE GC, RAI AN. 2016. Osmolyte accumulation and implications in plant abiotic stress tolerance[J]. Springer India: 1-12.
TURHAN E, ERGIN S. 2012. Soluble sugars and sucrose-metabolizing enzymes related to cold acclimation of sweet cherry cultivars grafted on different rootstocks[J]. The Sci World J, 2012(2): 1-7.
WANG HL, LEE PD, CHEN WL, et al., 2000. Osmotic stress-induced changes of sucrose metabolism in cultured sweet potato cells[J]. J Exp Bot, 51(353): 1991-1999.
WANG LJ, LI TL. 2011. Effect of low night temperature treatment on sucrose synthesis ability of tomato leaves in seedling stage[J]. Agr Sci Technol, 12(5): 707-709.
WEN B, WANG R, SONG S. 2009. Cytological and physiological changes related to cryotolerance in orthodox maize embryos during seed development[J]. Protoplasma, 236(1-4): 29-37.
WIND J, SMEEKENS S, HANSON J. 2010. Sucrose: metabolite and signaling molecule[J]. Phytochemistry, 71(14-15): 1610-1614.
ZENG Y, YU J, CANG J, et al., 2011. Detection of sugar accumulation and expression levels of correlative key enzymes in winter wheat (triticum aestivum) at low temperatures[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 75(4): 681-687.
ZÖRB C, SCHMITT S, MÜHLING KH. 2010. Proteomic changes in maize roots after short-term adjustment to saline growth conditions[J]. Proteomics, 10(24): 4441-4449.
ZULFIQAR F, AISHA N, ASHRAF M. 2019. Osmoprotection in plants under abiotic stresses: new insights into a classical phenomenon[J]. Planta, 251(1): 3-3.
QI HY, JIANG YY, HUA LJ. 2012. Responses to short-term low night temperature of sucrose-metabolizing in domesticated tomato and wild relative[J]. J Hortic, 39(2): 281-288. [齐红岩，姜岩岩，华利静. 2012. 短期夜间低温对栽培番茄和野生番茄果实蔗糖代谢的影响[J]. 园艺学报，39(2)：281-288.]
SUN HQ. Study on the physiological function of trehalose and abscisic acid induced by drought in the process of carbohydrate metabolism in apple[D]. Xianyang: Northwest A&F Universtiy, 2018. [孙汉青，2018. 干旱诱导的海藻糖和脱落酸在苹果糖代谢过程中的生理功能研究[D]. 咸阳：西北农林科技大学.]
YE XY, ZHOU WB. 2021. Research advances in plants fructokinase[J]. Chin Sci Bull, 66(22): 2820-2831. [叶香媛, 周文彬. 2021. 植物果糖激酶研究进展[J]. 科学通报，66(22)：2820-2831.]
ZHANG XN, HUANG N, QIN ZH, et al., 2020. Cryopreservation of sterile *Pinus massoniana* seeds[J]. Guihaia, 40(7): 935-943. [张晓宁，黄宁，覃子海，等，2020. 无菌马尾松种子超低温保存技术研究[J]. 广西植物，40(7)：935-943.]
ZHANG Z. Study on the role of sorbitil/sucrose in resisting drought stress in apple leaves[D]. Northwest Agr For Uni, 2016. [张钊，2016. 山梨醇和蔗糖在苹果抵抗干旱胁迫中的作用研究[D]. 西北农林科技大学.]
ZHOU H. Cryopreservation of *Paeonia emodi* seeds and the mechanism of seed water content affecting the viability[D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2021. [周好，2021. 多花芍药（*Paeonia emodi*）种子超低温保存及含水量对生活力影响的作用机制研究[D]. 北京：北京林业大学.]